LA REPRODUCCION DE LA RANA, HYLA LABIALIS

POR

ALICE S. HUNTER Y BEATRIZ MURCIA DE VALDIVIESO

I. — LA OVOGENESIS

En los países como los Estados Unidos o Europa, que tienen estaciones climatéricas definidas, normalmente las ranas ponen huevos solamente una vez durante el año. En Colombia se encuentran huevos de anfibios en el campo durante muchos meses del año. Sería por lo tanto interesante comparar la reproducción de las ranas de Colombia con la de los anfibios que viven en los países antes dichos. Primero, empezaremos con un estudio del proceso de ovogénesis.

Hay muchas descripciones del desarrollo de los ovocitos de las ranas de otros países; por ejemplo, de la *Rana pipiens* y de la *Rana fusca.* A fin de compararlas, consideraremos primero la ovogénesis en estas especies. En la naturaleza la *Rana pipiens* pone huevos generalmente durante abril o mayo; en el siguiente septiembre u octubre los ovocitos destinados a ser puestos en la primavera siguiente están suficientemente desarrollados para la ovulación. Durante este tiempo y en adelante se puede causar una ovulación artificial por la inyección de glándula pituitaria. Durante septiembre y octubre se necesitan más glándulas para la inducción de la ovulación que las que se necesitan durante enero o febrero. El crecimiento total de los ovocitos de la *Rana pipiens* generalmente se lleva a cabo durante tres años. La mayoría del crecimiento tiene lugar durante los tres veranos, y por eso, se encuentran tres grupos de ovocitos en el ovario de una rana madura.

Duryee (1950) ha estudiado muy detalladamente el crecimiento de los núcleos en los ovocitos. El distingue seis estados en su desarrollo. En el primero, los ovocitos más pequeños contienen vesículas germinales con cromosomas visibles. Las células más grandes de este grupo emigran hacia el interior del ovario y están rodeadas por un epitelio folicular; el citoplasma empieza a ser basofílico. En el segundo estado las células de 100 a 200 micras contienen cromosomas pareados. En el tercer estado puede verse el comienzo de las fibras o hilos laterales de los cromosomas en ovocitos de 200 hasta 500 micras. El borde del núcleo forma sáculos. Los nucléolos son abundantes periféricamente en el núcleo. Los "núcleos de yema" aparecen ahora concentrados hacia el interior del citoplasma. Las células del cuarto estado tienen un color amarillo que indica la disposición de la yema. También en estos ovocitos de 500 a 700 micras se ve el pigmento melanina en el polo animal. En el quinto estado, en las células de 750 a 850 micras de diámetro, los cromosomas están empezando a contraerse. Los cromosomas en el sexto estado están contraídos a más o menos un milésimo del volumen nuclear. Estos ovocitos maduros miden alrededor de 1.8 mm.

Kemp (1953) también ha descrito la ovogénesis en la *Rana pipiens* y especialmente el proceso de la formación de la yema. El ha dividido el proceso en cinco estados que difieren en la cantidad de yema que se encuentra en el citoplasma.

Panijel (1951) ha dividido la ovogénesis de la *Rana fusca* en las tres siguientes etapas: huevos con diámetro de menos de 100 micras, huevos de 100 a 200 micras y un tercer grupo de 250-1,500. En los ovocitos que miden alrededor de 50 micras de diámetro, el núcleo es relativamente grande y en muchas células se encuentra en una posición excéntrica. También hay algunas vacúolas que se tiñen con el rojo neutro como mitocondrias, y aparecen los "núcleos de yema" en el citoplasma. En la segunda etapa, el núcleo se vuelve más grande pero menos denso. Los "núcleos de yema" se han distribuído poco a poco en el conjunto de la masa celular. En los ovocitos de 120 micras y más de diámetro se notan dos bandas de mitocondrias. Más tarde la distribución se vuelve homogénea, pero con una disposición más abundante en la periferia de la célula. Se encuentran gránulos de glicógeno y plaquetas vitelinas en los ovocitos de 200 micras y más. La primera zona de vitelogénesis está situada periféricamente y da lugar a la formación de pequeñas plaquetas al principio, pero luégo de plaquetas más grandes cuyo tamaño alcanza a ser de 15 micras. La descripción de los cambios nucleares es más o menos igual a la de Duryee para la *Rana pipiens.*

Hechas estas descripciones podemos compararlas con la ovogénesis de la *Hyla labialis,* la rana más común y abundante en Bogotá, que fue descrita por E. R. Dunn en 1944:

Hyla labialis Peters 1863, Mon. Ak. Berlin, p. 463.

Hyla vilsoniana Cope 1899, p. 3, pl. 1, f. 1.
Hyla servalina Werner 1899, p. 483.
Hyla creolica Werner 1899, p. 484.
Hyla gularis Werner 1916, p. 302.

METODOS Y RESULTADOS

Esta investigación comprende las siguientes partes:

I. Inducción artificial para la postura de huevos.

II. Contaje y medida de ovocitos y huevos enteros.

III. Estudio de secciones de ovarios.

Machos y hembras de la *Hyla labialis* pueden distinguirse por el tamaño del cuerpo y también por el pulgar de las patas que en los machos es más negro y grueso que en las hembras. Por inducción artificial hemos demostrado en nuestro laboratorio que machos de 35-43 mm. de largo son capaces de fertilizar huevos, y que hembras de 45-57 mm. pueden poner huevos. En general las ranas más pequeñas no tienen las gónadas maduras. Se induce la ovulación y fertilización con la inyección de dos a cuatro glándulas pituitarias (en suspensión salina) de *Bufo marinus* en el abdomen de cada rana. Se pueden de esta manera obtener huevos fertilizados durante los meses de octubre a junio. También es posible obtener huevos fertilizados en los otros meses, pero se necesita inyectar muchas ranas para encontrar un par fértil. Se usan glándulas pituitarias de Bufo porque siendo más grandes, son más fáciles de obtener y más efectivas.

Se han medido y contado los ovocitos de muestras de ovarios de distintas ranas. En algunos casos las muestras estuvieron colocadas en solución salina isotónica (NaCl 0.66%) y en otros, los ovarios habían sido fijados en formol al 10%. Se seleccionó al azar una pequeña parte de un ovario. En tal muestra todos los ovocitos más grandes de 0.200 mm. fueron medidos y contados usando un aumento de 31.25 y un ocular micrométrico. Los resultados de las muestras de 5 ovarios no maduros, de 10 ovarios posiblemente maduros y de 5 ovarios después de la ovulación se ven en la tabla número 1. Se consideraron como "no maduros" ovarios de ranas que no ovularon después de la inyección de 8 pituitarias de Bufo. El grupo de 10 ovarios maduros se sacó de hembras de 45 mm. o más de largo.

En la tabla número 1 se ve que no se contaron ni midieron células de diámetro de menos de 0.200 mm. El problema es que las células grandes y opacas cubren las células pequeñas y transparentes. Por eso, se estudiaron también secciones de ovarios.

Medidas de huevos fertilizados de 10 hembras mostraron diámetros entre 1.24 hasta 1.64 mm.

Algunos ovarios fijados en formol, y otros en el fijador de Bouin o de Smith se prepararon por los métodos histológicos comunes y corrientes. Secciones en serie de muestras de cada ovario se cortaron a 12 micras y se colorearon con hematoxilina y eosina. En total se estudiaron muestras de 6 ovarios normales. Para compararlos con las medidas de las células en ovarios enteros hay que tener en cuenta el encogimiento durante el proceso histológico. Algunos cálculos aproximados muestran, por ejemplo, que los ovocitos más grandes tienen un diámetro en secciones que es de 25-90% del diámetro de los mismos ovocitos de la fijación. Se hicieron secciones en serie porque es necesario buscar la sección central de cada célula. Como en las secciones algunas de las células no presentaron una forma completamente esférica, hubo que tomar las medidas en dos dimensiones y luégo hallar el promedio. Se midieron células escogidas al azar, utilizando secciones suficientemente separadas para evitar medir la misma célula dos veces.

En la tabla número 2 se ven los promedios de grupos de medidas de células y sus núcleos. Cada promedio es de un grupo de células con un alcance de cien micras. Por ejemplo, el promedio de 0.548 mm. es para el grupo de células con un diámetro de 0.500 hasta 0.599 mm. y de tales células el promedio de las medidas de los núcleos es 0.188 mm. También en esta tabla se ve la proporción del volumen de la célula que el núcleo ocupa. Entre el diámetro de la célula y la proporción del volumen celular, se ve que a menor diámetro de la célula corresponde mayor proporción del volumen celular que el núcleo ocupa. Cuando el diámetro de las células es más grande, la proporción del volumen de la célula que el núcleo ocupa disminuye.

Se estudiaron los cambios citológicos en los núcleos y el citoplasma. Se contaron y se apuntó la distribución de los nucléolos de cien ovocitos de varios diámetros. Además se midieron y se apuntó la distribución de las plaquetas vitelinas en otros cien ovocitos. En secciones de siete ovarios se midió el diámetro de diez de las células más pequeñas de cada ovario que contenían gránulos de melanina.

Uniendo todas las observaciones y estudiando todas las características citológicas que se pueden ver en estas secciones de ovarios se describe la ovogénesis en la siguiente manera:

Las ovogonias son pequeñas células que se encuentran en la pared del ovario. El citoplasma se tiñe azul pálido en estas preparaciones con hematoxilina y eosina. El núcleo también es pálido y contiene hilos de cromatina que se tiñen de azul oscuro. Las ovogonias tienen un diámetro de 0.016 mm. y más.

Células de 0.080 mm. de diámetro están rodeadas por una capa folicular que a veces parece continua. Células de 0.100 mm. se pueden llamar ovocitos sin duda. El citoplasma de los ovocitos más pequeños se tiñe intensamente de azul. También el núcleo es basofílico y generalmente contiene una mancha roja que puede ser un nucléolo o un grupo de nucléolos. En los ovocitos que tienen un diámetro entre 0.100 y 0.300 mm. el citoplasma se tiñe de azul pálido. El número de nucléolos aumenta y se tiñen de rojo teniendo una apariencia vacuolada. El borde del núcleo demuestra una forma irregular.

La aparición de las plaquetas vitelinas empieza en los ovocitos que tienen un diámetro entre 0.350 y 0.400 mm. Las primeras plaquetas son de cuatro micras de largo, acidofílicas y se encuentran en la periferia de las células justamente dentro de la membrana celular. En los ovocitos de este tamaño la cantidad de nucléolos aumenta y se pueden ver en todas partes del núcleo. La membrana nuclear sigue con su forma ondulada irregular.

Los ovocitos que miden 0.500 mm. y más de diámetro contienen muchas plaquetas vitelinas con un largo de cinco micras. Las plaquetas vitelinas se tiñen de rosado y la yema se ve claramente como una banda rosada que ha avanzado casi la mitad de la distancia entre la membrana celular y la membrana nuclear. Ahora, unos pocos nucléolos se tiñen de azul, pero la mayoría todavía son acidofílicos. Unos nucléolos se mueven periféricamente hacia la membrana nuclear.

Células que tienen un diámetro de más o menos 0.700 mm. contienen gránulos del pigmento melanina en el citoplasma periférico. Las plaquetas vitelinas que todavía se tiñen de rosado siguen aumentando en número y tamaño y llenan casi todo el citoplasma. El largo de las plaquetas es entre seis y siete micras. Los nucléolos se encuentran en mayor número debajo de la membrana nuclear. Una cantidad mayor de los nucléolos se tiñe de azul.

Los ovocitos que tienen un diámetro entre 0.800 y 0.900 mm. están llenos de yema. Las plaquetas vitelinas han avanzado hasta la membrana nuclear. Algunas de las plaquetas centrales se tiñen de azul, mientras que las que están en la periferia siguen tiñéndose de rosado. Los gránulos de melanina aumentan en el polo animal y se mueven hacia más adentro. En estas células nos parece que el núcleo se ha encogido mucho durante la preparación histológica. La membrana nuclear tiene una forma irregular, y se ve un espacio entre el citoplasma y la membrana. Los nucléolos están en la periferia del núcleo, justamente debajo de la membrana nuclear. Algunos de los nucléolos se tiñen de azul ahora en lugar de rojo.

De ahora en adelante no se ven muchos cambios citológicos. Los ovocitos aumentan en tamaño hasta un diámetro de 1.3 mm. en secciones. El núcleo se mueve hacia la superficie del polo animal. En el centro del núcleo es posible ver un grupo de cromosomas rodeados por los nucléolos. La membrana nuclear todavía tiene una forma irregular y encogida. Las plaquetas vitelinas siguen aumentando en cantidad y tamaño. Tienen un largo que varía entre cinco y diez micras. Las plaquetas más pequeñas están en el hemisferio animal. En el centro del ovocito están las plaquetas de tamaño medio y las plaquetas más largas están en el polo vegetal. En estos ovocitos maduros, listos para la ovulación, el conjunto del citoplasma y las plaquetas se tiñen de azul pálido.

En todos los ovarios estudiados había células en todos los estados de ovogénesis. Como se mencionó anteriormente, se encuentran tres grupos de ovocitos en los ovarios maduros de la *Rana pipiens*. En los ovarios de *Hyla labialis* no se encontraron tales grupos de ovocitos. Por eso decidimos estudiar un ovario inmediatamente después de la ovulación para ver si era semejante a los ovarios de *Rana pipiens* estudiados por Kemp. Se pensó que midiendo los huevos ovulados y los ovocitos que se quedaron en el ovario, sería fácil saber si existía una descontinuidad entre los dos grupos. Se midieron y se contaron todas las células de un ovario entero. Se siguió cada célula en las secciones en serie y se midió el diámetro más grande. Este estudio trabajoso se hizo muy cuidadosamente para evitar contar la misma célula dos veces. Los resultados se ven en la tabla número 3. Se encuentran células de todos los diámetros hasta 1.000 mm. y un poco más grande. El grupo de las células más pequeñas no se incluye en los cálculos de porcentaje porque algunas son ovogonias todavía, y es muy difícil decidir si una célula es ovocito u ovogonia. Algunas de las células en este grupo están parcialmente rodeadas por células foliculares y otras no. Los ovocitos que miden hasta 0.199 mm. constituyen 61% de la cantidad total de ovocitos. Células entre 0.200 y 0.399 son 20%, y los ovocitos de 0.400 y más grandes constituyen 19%.

DISCUSION DE LOS RESULTADOS

Según la investigación que se realizó, se puede decir que existen algunas diferencias en el proceso de la ovogénesis de las ranas de países con estaciones y la rana *Hyla labialis*, de Bogotá, Colombia.

Primero, el tiempo durante el cual se encuentran ranas con huevos maduros es distinto. En los Estados Unidos, por ejemplo, los ovarios de las ranas contienen huevos maduros generalmente desde septiembre en adelante. Desde el tiempo de postura de huevos hasta septiembre ninguna rana de una especie como *Rana pipiens*, por ejemplo, tiene huevos maduros. Aquí si uno ensaya suficientes ranas, se pueden encontrar algunas ranas fértiles durante cualquier mes del año. Sería muy interesante hacer un cuidadoso estudio en el campo durante unos años para averiguar si se encuentran huevos de *Hyla labialis* en la naturaleza durante todos los meses del año. En nuestro laboratorio se empezó un estudio del estado de madurez de las gónadas de ranas coleccionadas mensualmente. Tal vez, esto nos da alguna información acerca del ciclo de reproducción de esta especie.

Consideremos las medidas y cantidad de los ovocitos en ovarios enteros. Ovarios estudiados después de la ovulación tienen ovocitos de todos los tamaños hasta 1.200 mm. En los ovarios de especies como *Rana pipiens* y *Rana temporaria* los ovocitos que tienen dos años de crecimiento alcanzan a tener más o menos 0.400 mm. de diámetro y no crecen más hasta después de la ovulación del grupo maduro. Esta es una diferencia muy interesante entre *Hyla labialis* y las ranas de los países que tienen estaciones climatéricas.

En general, los cambios citológicos durante la ovogénesis son semejantes a los descritos por Duryee, Kemp, Panijel y otros. Las plaquetas vitelinas y la melanina aparecen en ovocitos de más o menos el mismo diámetro que los de *Rana pipiens*. Kem escribe que en la *Rana pipiens* la formación de la yema principia al tiempo de la ovulación de los ovocitos maduros. Es interesante que en la *Hyla labialis*, al tiempo de la ovulación, existen muchos ovocitos de 0.350 mm., y más grandes que contienen plaquetas vitelinas.

Para saber precisamente la cantidad de ovocitos de distintos tamaños que se encuentran en el ovario inmediatamente después de la ovulación, se realizó el último estudio que se ve en la tabla número 3. Esta demuestra claramente que 19% de los ovocitos tienen 0.400 mm. y más de diámetro. En nuestro laboratorio se piensa que los resultados de esta investigación demuestran un proceso de ovogénesis que es continuo. Es decir, que en *Hyla labialis* el desarrollo y crecimiento de los ovocitos sigue continuamente durante todos los meses, mientras que en las ranas de otros países solamente sigue durante el verano y se detiene durante el invierno. También el crecimiento de los ovocitos de las ranas de países con estaciones es por grupos, y en un ovario inmediatamente después de la ovulación casi no se encuentra ninguna célula más grande que 0.400 mm. Durante los siguientes meses los ovocitos que van a ser puestos en la primavera crecen juntos, todos llegando al estado de madurez a más o menos el mismo tiempo.

Como se mencionó anteriormente, en el ovario de una rana madura como *Rana pipiens*, se encuentran tres grupos de huevos, que son los huevos que se ponen durante tres años. Haciendo algunos cálculos con *Hyla labialis* sale un dato muy interesante. Se calculó que una hembra pone a una vez entre 300 y 500 huevos. En el ovario estudiado inmediatamente después de la ovulación se encuentran 223 ovocitos de 0.500 mm. y más grandes. Esta cantidad completa el número que se espera de un ovario en una postura. Si estos cálculos tienen razón se ve que hay suficientes ovocitos en el ovario para poner huevos cinco veces más. Es decir, que existen ovocitos para seis posturas de huevos en total, en un ovario después de la ovulación, mientras que existen solamente dos grupos de ovocitos en un ovario de *Rana pipiens*. También los huevos que van a ser puestos próximamente por *Hyla labialis* tienen todos un tamaño más grande que el ovocito más grande que se encuentra en el ovario de *Rana pipiens* inmediamente después de la ovulación. Es probable que estas diferencias resultan de la continuidad del proceso de ovogénesis en *Hyla labialis*.

TABLA NUMERO 1

CELULAS ENTERAS DE OVARIOS

Diámetro en mm.	OVARIOS MADUROS Número	Porcentaje	NO MADUROS Número	Porcentaje	DESPUES DE LA OVULACION Número	Porcentaje
1.601-1.800	58	3				
1.401-1.600	226	13				
1.201-1.400	239	14				
1.001-1.200	400	23	71	12	26	9
0.801-1.000	210	12	134	22	48	16
0.601-0.800	189	11	128	21	42	14
0.401-0.600	224	13	83	14	88	30
0.201-0.400	194	11	187	31	93	31

TABLA NUMERO 2

NUCLEOS DE OVOCITOS

PROMEDIOS DE DIAMETRO

Número de medidas	Células	Núcleos	Proporción
19	0.081	0.048	0.20
12	0.157	0.082	0.14
24	0.257	0.130	0.13
19	0.351	0.164	0.11
32	0.443	0.182	0.07
23	0.548	0.188	0.04
20	0.641	0.231	0.04
21	0.742	0.243	0.03
19	0.844	0.235	0.02
37	0.940	0.250	0.02
51	1.030	0.253	0.01

Proporción. La última columna se refiere a la proporción de volumen de la célula entera que el núcleo ocupa. Se calcula dividiendo el diámetro del núcleo al cubo, por el diámetro de la célula al cubo.

TABLA NUMERO 3

OVARIO DESPUES DE LA OVULACION

Diámetro de las células	Cantidad de las células	Porcentaje
1.000 y más grande	10	0.6
0.900-0.999	23	1.5
0.800-0.899	38	2.4
0.700-0.799	51	3.3
0.600-0.699	46	3.0
0.500-0.599	55	3.5
0.400-0.499	74	4.7
0.300-0.399	97	6.2
0.250-0.299	82	5.2
0.200-0.249	139	8.9
0.150-0.199	360	23.1
0.100-0.149	587	37.6
0.050-0.099	444	no se incluyen

RESUMEN

1. Se estudió la ovogénesis en la *Hyla labialis* para compararla con el mismo proceso en las ranas que viven en países con estaciones climatéricas definidas. Por inyección de glándula pituitaria se pueden obtener huevos fertilizados durante los meses de octubre a junio, y rara vez en los otros meses.

2. Se midieron y se contaron ovocitos enteros en muestras de ovarios maduros, inmaduros y después de la ovulación. Hay ovocitos de todos los tamaños presentes en los ovarios maduros; en los ovarios no maduros, y después de la ovulación hay células de todos los tamaños hasta 1.200 mm. de diámetro.

3. En secciones de ovarios se midió el diámetro de las células y de los núcleos y plaquetas vitelinas. Se estudiaron los cambios citológicos de los núcleos y también del citoplasma. Las plaquetas vitelinas aparecen en células que tienen un diámetro de 0.350 a 0.400 mm. La melanina aparece en ovocitos que tienen 0.700 mm. o más de diámetro. En general, los cambios citológicos son muy semejantes a los descritos por otros investigadores en otras especies.

4. La diferencia más obvia e interesante entre la ovogénesis de la *Hyla labialis* y la de otras especies descritas es la presencia de ovocitos de todos los tamaños y en cantidades grandes en el ovario inmediatamente después de la ovulación. Se piensa que los resultados demuestran que el proceso de ovogénesis sigue durante todos los meses sin detenerse como se hace en países con estaciones climatéricas definidas.

SUMMARY

1. Oögenesis of the frog, *Hyla labialis* has been studied in order to compare it with the same process in frogs which live in countries with definite climatic seasons. Fertilized eggs can be obtained after pituitary injection during the months of October through June and occasionally during the rest of the year.

2. Whole oöcytes were measured and counted in samples taken from mature ovaries, immature ovaries and ovaries after ovulation had taken place. There are oöcytes of all sizes present in mature ovaries; in immature ovaries and ovaries after ovulation there are cells of all sizes up to 1.200 mm. diameter.

3. In sections of ovaries, the diameter of the cells, of the nuclei and of the yolk platelets was measured. The cytological changes in the nuclei and cytoplasm were studied. Yolk platelets first appear in cells which have a diameter of 0.350 to 0.400 mm. Melanin is first found in cells of 0.700 mm. or more in diameter. In general, the cytological changes are similar to those described by other investigators for other species.

4. The most obvious and interesting difference between oögenesis in *Hyla labialis* and other species previously studied is the presence of oöcytes of all sizes and in large quantities in the ovaries studied immediately after ovulation occured. The results reported in this paper suggest that oögenesis is a continuous process throughout the entire year here in Bogotá, Colombia. In this respect it differs from that described for amphibians which live in countries with definite climatic seasons in which the growth of oöcytes is a discontinuous process and takes place in distinct groups of cells developing simultaneously.

BIBLIOGRAFIA

BARTH, LESTER G. y LUCENA J. BARTH. 1954. — *The Energetics of Development.* Columbia Univ. Press, 1954.

DUNN, EMMETT REID, 1944. — *Herpetology of the Bogotá Area.* Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, 6, 21, pp. 68-81.

DURYEE, WILLIAM R. 1950. — *Chromosomal Physiology in Relation to Nuclear Structure.* Ann. N. Y. Acad. Sci. 50, pp. 920-953.

KEMP, NORMAN E. 1953. — *Synthesis of yolk in oocytes of* RANA PIPIENS *after induced ovulation.* J. Morph. 92, pp. 487-512.

PANIJEL, JACQUES. 1951. — *Métabolisme des nucléoprotéines dans la gamétogenèse et la fécondation.* Hermann et Cie., Paris.

RUGH, ROBERTS. 1948. — *Experimental Embryology.* Burgess Publishing Co. Minnesota, EE. UU.

RYAN, FRANCIS J. y R. GRANT. 1940. — *The stimulus for maturation and for ovulation of the frog's egg.* Physiol. Zool., 13, pp. 383-389.